

ISOLASI ENZIM HORSERADISH PEROKSIDASE (HRP) DARI KULTUR SEL DAUN *ARMORACIA LAPATIFOLIA* DENGAN CARA FRAKSINASI MENGGUNAKAN AMONIUM SULFAT

A.T. Karossi dan S. Pudjiraharti,

Pusat Penelitian Kimia – LIPI, Jl. Cisit-Sangkuriang, Bandung 40135

INTISARI

Isolasi enzim HRP hasil kultur sel dari daun *Armoracia lapatifolia* dilakukan dengan cara fraksinasi menggunakan ammonium sulfat. Optimasi proses fraksinasi dilakukan dengan cara pemekatan ekstrak kasar enzim, mencari tahapan-tahapan fraksinasi dan konsentrasi amonium sulfat yang sesuai serta cara-cara pemisahan endapan hasil fraksinasi. Fraksinasi dengan dua tahapan konsentrasi amonium sulfat (0 - 40% dan 40 - 85% jenuh) lebih menguntungkan dibandingkan fraksinasi dengan tahapan yang lebih banyak (selang konsentrasi yang kecil), karena didapat perolehan aktifitas yang lebih tinggi dan kemurnian enzim yang juga cukup tinggi. Pada fraksinasi 0 - 40% jenuh diperoleh enzim dengan kemurnian 23 kali dan perolehan 11,4%, sedangkan pada fraksinasi 40 - 85% jenuh diperoleh enzim dengan kemurnian 43 kali dan perolehan rendemen 60 %..

Kata Kunci : Horseradish Peroksidase, *Armoracia Lapatifolia*

ABSTRACT

Isolation of HRP (Horseradish Peroksidase) from *Armoracia lapatifolia* plant cell culture was conducted by fractionation using ammonium sulfate. Optimization of the fractionation process was carried out by concentrating the crude enzyme, investigating the fractionation stages and precipitation with ammonium sulfate.. Two-stage fractionation namely with 0 - 40% and 40 - 85 % saturation of ammonium sulfate gave better results interms of enzyme activity. In 0 - 40% saturation, the purity was 23 fold with 11.4% yield. The

highest yield , 60% and purify of 43 folds were showed by fraction which were obtained at fractionation 40 - 85% saturation.

Keyword : Horseradish Peroksidase, *Armoracia Lapatifolia*

PENDAHULUAN

Peroksidase merupakan kelompok enzim yang cukup penting dan secara luas digunakan dalam bidang laboratorium klinik untuk pengukuran berbagai material biologi secara kolorimetri. Enzim peroksidase mempunyai sifat dapat mengkatalisis reaksi oksidasi berbagai senyawa aromatik seperti fenol, hidrokuinon dan amino hidrokuinon terutama turunan benzidin⁽¹⁾. Secara luas enzim peroksidase telah ditemukan pada berbagai spesies tanaman dan mikroorganisme. Sampai dengan saat ini, produksi enzim peroksidase komersial dilakukan dengan cara ekstraksi akar tanaman horseradish yang banyak tumbuh di negara yang beriklim relatif lebih dingin⁽²⁾.

Teknik kultur jaringan dan kultur sel tanaman telah banyak dipelajari sebagai salah satu cara untuk memproduksi enzim. Teknik tersebut telah diterapkan pada produksi enzim peroksidase dari tanaman buncis, kacang polong, buah jeruk limau⁽³⁾ dan tanaman horseradish^(4,5,6) dengan hasil aktifitas enzim yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan jika enzim tersebut diisolasi langsung dari tanamannya. Enzim peroksidase juga telah berhasil dimurnikan dari berbagai spesies tanaman seperti buah kiwi⁽⁷⁾, tomat⁽⁸⁾ dan lobak⁽⁹⁾. Dalam teknik pemurnian

enzim, kemurnian dan perolehan enzim yang dihasilkan merupakan nilai karakteristik keefektifan prosedur yang digunakan, diharapkan terjadi peningkatan kemurnian yang besar dan perolehan yang tinggi lebih dari 50%⁽¹⁰⁾. Pemurnian enzim HRP (*Horseradish Peroksidase*) hasil kultur sel tanaman horseradish telah dilakukan pada penelitian sebelumnya^(5,6) menunjukkan bahwa proses fraksinasi yang dilakukan belum optimal juga karena konsentrasi enzim dalam ekstrak kasar terlalu rendah sehingga proses pengendapan tidak berlangsung optimal.

Pada tujuan ini dijelaskan cara-cara produksi enzim peroksidase dengan teknik kultur sel tanaman horseradish, isolasi HRP dengan cara fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan hasil-hasil yang diperoleh.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Akar horseradish Peroksidase diperoleh dari Canada, ditanam di dalam pot yang berisi tanah Lembang. Daun muda yang tumbuh digunakan sebagai eksplan yaitu potongan jaringan yang akan ditanam pada media agar padat. Bahan-bahan untuk medium berasal dari Difco dan bahan-bahan kimia dari E. Merck dan Sigma.

Metoda

Induksi Kalus

Daun muda horseradish dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, selanjutnya disterilkan dengan larutan 0,5 % Na-hipoklorit yang mengandung 0,01 % Tween-80 selama 15 menit. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak lima kali, kemudian dipotong-potong secara aseptis dan ditanam dalam medium padat dasar Linsmaier-Skoog (LS)^(4,11) yang mengandung : NAA 10^{-5} M dan kinetin 10^{-6} M dan ditambah zat pengatur tumbuh naphthalene acetic acid (NAA) 6,7 M dan benzyl amino purine (BAP) 25 M.

Inkubasi dilakukan pada suhu kamar, keadaan gelap selama 30 hari.

Sub-kultur Kalus

Kalus yang tumbuh pada medium induksi dipotong-potong secara aseptis dan ditanam kembali pada medium padat LS seperti tersebut yang steril dan mengandung NAA 10^{-5} M dan kinetin 10^{-6} M. Inkubasi dilakukan pada kondisi yang sama dengan induksi kalus selama tiga minggu.

Kultur Sel

Kalus hasil sub-kultur ditanam secara aseptis ke dalam 25 ml medium cair LS tersebut diatas yang steril dan mengandung NAA 10^{-5} M dan kinetin 10^{-6} M. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar dengan guncangan 100 rpm, keadaan gelap selama tiga minggu.

Fraksinasi Horseradish Peroksidase (HRP)

Cairan medium hasil kultur sel dipisahkan dari masa sel dengan cara penyaringan. Filtrat yang diperoleh merupakan ekstrak enzim ekstraseluler dan masa sel merupakan sumber enzim intraseluler. Ekstrak kasar enzim terlebih dahulu dipekatkan menggunakan alat pengering beku selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan kejenuhan antara 0-85% amonium sulfat dengan interval kejenuhan 10%. Campuran enzim yang telah diendapkan dengan ammonium sulfat selanjutnya didiamkan semalam, kemudian disentrifuga pada kecepatan 12.500 rpm selama 20 menit kondisi suhu 4°C. Endapan hasil sentrifugasi dilarutkan dalam larutan 0,01 M bufer fosfat pH 6,0. Seluruh tahapan pekerjaan tersebut dilakukan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Setelah diperoleh data hasil fraksinasi tersebut di atas, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan kejenuhan 0-40%, 40-70%, 70-85% terhadap sejumlah volume ekstrak kasar enzim yang lain dan dari data hasil fraksinasi yang diperoleh dilakukan fraksinasi dengan kejenuhan 0-40% dan 40-85%.

Dialisis

Larutan enzim hasil fraksinasi dimasukkan ke dalam kantung selofan dan dimasukkan ke dalam suatu bejana dialisis yang berisi larutan bufer fosfat 0,01 M pH 6,0. Bejana ditempatkan di atas pengaduk magnetik yang dipasang dengan kecepatan rendah di dalam ruangan dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Dialisis dilakukan selama 48 jam dengan cara mengganti larutan beberapa kali dengan larutan bufer fosfat 0,01 M pH 6,0.

Analisis

Analisis aktifitas peroksidase ditentukan dengan metoda Willstater dan Stoll menggunakan pirogalol sebagai donor hidrogen dengan sedikit modifikasi ⁽¹³⁾. Satu unit aktifitas didefinisikan sebagai jumlah mg purpurogallin yang dihasilkan oleh sejumlah enzim pada suhu 20°C selama 5 menit. Analisis kadar protein enzim ditentukan dengan metoda Lowry ⁽¹²⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi proses fraksinasi

Hasil fraksinasi enzim ekstrak kasar dengan kejenuhan 0-85% dan interval kejenuhan 10% setelah sebelumnya dipekatkan terlebih dahulu 6,35 kali disajikan pada Tabel 1. Pada fraksinasi dengan kejenuhan 0-10% terbentuk endapan, tetapi aktifitasnya sangat kecil. Fraksinasi dengan kejenuhan 10-20%, 20-30% dan 30-40% tidak memperlihatkan adanya endapan. Pada fraksinasi dengan kejenuhan 40-50% diperoleh endapan dengan aktifitas spesifik enzim 3,16 unit per mg protein, tingkat kemurnian sekitar tiga kali dan perolehan 7,30%. Fraksinasi dengan kejenuhan 50-60% dan 60-70% menghasilkan endapan dengan aktifitas spesifik, kemurnian dan perolehan yang hampir sama. Pada fraksi 50-60% diperoleh aktifitas 3,15 unit per mg protein,

Tabel 1. Fraksinasi enzim HRP dengan menggunakan 9 tahap konsentrasi ammonium sulfat setelah terlebih dahulu dipekatkan 6,35 kali

Fraksi (NH_4) ₂ SO ₄	Total Aktifitas (Unit)	Total Protein (mg)	Aktifitas Spesifik (U/mg protein)	Kemurnian	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	275	278,25	0,99	1	100
0-10%, endapan	0,07				
10-20%	tidak ada endapan				
20-30%	tidak ada endapan				
30-40%	tidak ada endapan				
40-50%, endapan	20,10	6,37	3,16	3,19	7,31
50-60%, endapan	9,93	3,15	3,15	3,18	3,60
60-70%, endapan	9,81	3,31	2,96	2,99	3,57
70-80%, endapan	14,16	2,58	5,49	5,54	5,15
80-85%, endapan	16,75	1,67	10,03	10,13	6,10
Total perolehan					25,73

Keterangan : Sentrifugasi enzim hasil fraksinasi dilakukan pada kecepatan 12.500 rpm selama 30 menit.

kemurnian sekitar tiga kali dan perolehan 3,16%, sedangkan pada fraksi 60-70% diperoleh aktifitas 2,96 unit per mg protein, kemurnian sekitar tiga kali dan perolehan 3,57%. Fraksinasi dengan kejenuhan 70-80% menghasilkan endapan dengan aktifitas spesifik lebih tinggi 5,49 unit per mg protein, kemurnian sekitar 5 kali dengan perolehan 5,51%. Hasil tertinggi diperoleh pada fraksi 80-85 % dengan aktifitas spesifik 10,03 unit per mg protein, kemurnian sekitar 10 kali dan perolehan 6,10%. Apabila perolehan aktifitas enzim seluruh fraksi dijumlahkan, didapat total perolehan sebesar 25,73%, yang jauh lebih besar dibandingkan hasil penelitian sebelumnya, 3,17%^(5,6).

Untuk lebih meningkatkan perolehan dan kemurnian enzim selanjutnya dicoba melakukan fraksinasi dengan cara mempersingkat tahapan proses fraksinasi. Diperkirakan fraksinasi dengan interval konsentrasi amonium sulfat yang kecil, sebagian enzim mengalami denaturasi akibat pengadukan yang berulang-ulang sehingga aktifitasnya hilang. Sebagai sumber enzim digunakan ekstrak kasar enzim hasil pemekatan 8,3 kali. Dari data aktifitas yang diperoleh pada fraksinasi sebelumnya, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan kejenuhan 0-40%, 40-70% dan 70-85%, kemudian didialisis. Hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Fraksinasi enzim HRP dengan menggunakan tiga tahap konsentrasi ammonium sulfat setelah terlebih dahulu dipekatkan 8,3 kali.

Fraksi (NH ₄) ₂ SO ₄	Total Aktifitas (Unit)	Total Protein (mg)	Aktifitas Spesifik (U/mg protein)	Kemurnian	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	13,70	541	0,03	1	100
0-50% endpatan	1,03	4,50	0,23	7,67	7,52
40-70%, endapan	4,20	17,48	0,24	8,00	30,66
70-80%, endapan	0,93	5,79	0,16	5,33	6,79
Total perolehan					44,97
0-40% dialisis	1,24	2,75	0,45	15,00	9,05
40-70% dialisis	4,42	5,14	0,86	28,60	32,26
70-85% dialisis	1,41	0,26	5,42	180,67	10,29
Total perolehan					51,60

Keterangan : Sentrifugasi enzim hasil fraksinasi dilakukan pada kecepatan 12.500 rpm selama 30 menit.

Pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa aktifitas spesifik enzim tertinggi, 5,42 unit per mg protein dengan perolehan 10,29% diperoleh pada fraksinasi dengan kejenuhan 70-85% setelah dialisis dengan tingkat kemurnian sekitar 180 kali dibandingkan ekstrak kasarnya. Perolehan aktifitas tertinggi 32,26% ditunjukkan pada fraksinasi dengan kejenuhan 40-70% dengan aktifitas spesifik 0,86 unit per mg protein dan kemurnian sekitar 27 kali. Apabila perolehan setiap fraksi dijumlahkan maka didapat total perolehan aktifitas 44,97% sebelum dialisis dan meningkat menjadi 51,60% setelah dialisis. Perolehan tersebut lebih besar dibandingkan hasil fraksinasi sebelumnya 25,73% (Tabel 1). Fraksinasi dengan kejenuhan 0-40% dan 40-85% dicoba dilakukan terhadap sumber ekstrak kasar enzim yang sama. Hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 3.

Pada Tabel 3, ditunjukkan bahwa aktifitas spesifik tingkat kemurnian dan perolehan tertinggi didapat pada fraksinasi dengan kejenuhan 40 - 80%. Aktifitas spesifik enzim 0,34 unit per mg protein dengan tingkat kemurnian 11 kali dan perolehan 86,98% dihasilkan sebelum tahap dialisis, setelah dialisis aktifitas spesifik enzim meningkat menjadi 1,29 unit per mg protein dengan tingkat kemurnian 42,87 kali dan perolehan 59,65 %. Pada fraksinasi 0 - 40% setelah dialisis diperoleh aktifitas spesifik 0,69 unit per mg protein dengan kemurnian 23 kali dan perolehan 11,38%. Apabila perolehan masing-masing fraksi setelah tahap dialisis dijumlahkan, maka akan didapat total perolehan sebesar 71,03% lebih besar dari pada perolehan pada fraksinasi tiga tahap sebelumnya, 51,60% (Tabel 2).

Tingkat kemurnian dan perolehan aktifitas merupakan parameter tingkat keberhasilan suatu proses pemurnian enzim. Makin tinggi tingkat kemurnian perolehan enzim yang dihasilkan,

Tabel 3. Fraksinasi enzim HRP dengan dua tahap konsentrasi ammonium sulfat.

Fraksi (NH ₄) ₂ SO ₄	Total Aktifitas (Unit	Total Protein (mg)	Aktifitas Spesifik (U/mg protein)	Kemurnian	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	16,43	649	0,03	1	100
0-40% endapan	1,80	7,70	0,23	7,80	10,96
40-80%, endapan	14,29	42,00	0,34	11,33	86,98
Total perolehan					97,94
0-40% dialisis	1,87	2,72	0,69	23	11,38
40-80% dialisis	9,80	7,62	1,29	42,87	59,65
Total perolehan					71,03

Keterangan : Sentrifugasi enzim hasil fraksinasi dilakukan pada kecepatan 12.500 rpm selama 30 menit.

makin baik proses pemurnian yang telah dilakukan. Pada proses fraksinasi enzim HRP yang telah dilakukan terlihat bahwa makin tinggi konsentrasi amonium sulfat, semakin tinggi tingkat kemurnian enzim yang diperoleh dan makin kecil interval konsentrasi amonium sulfat, semakin kecil perolehan aktifitasnya.

Fraksinasi dua tahap nampaknya lebih menguntungkan, disamping didapatnya perolehan yang cukup tinggi 11,38% (fraksi 0 - 40%) dan 59,65% (fraksi 40-80%), juga didapat kemurnian enzim yang cukup tinggi pula, 23 kali (fraksi 0 - 40%) dan 43 kali (fraksi 40 - 80%). Secara teoritis diperkirakan, apabila dilakukan fraksinasi satu tahap 0 - 80%, akan didapat perolehan enzim yang lebih besar tetapi dengan tingkat kemurnian lebih kecil. Perolehan yang tinggi pada proses fraksinasi diperlukan agar pada pemurnian lebih lanjut masih didapat perolehan yang cukup tinggi lebih dari 50%. Disarankan agar pada penelitian selanjutnya fraksinasi enzim dilakukan dengan kejenuhan amonium sulfat 0-80%. Proses sentrifugasi dengan putaran yang lebih tinggi dan waktu yang relatif lebih lama (12.500 rpm, 30 menit) pada pemisahan endapan hasil fraksinasi juga dapat menyebabkan perolehan yang lebih baik dibandingkan dengan fraksinasi pada penelitian terdahulu^(5,6). Pada kecepatan putaran yang lebih tinggi endapan yang diperoleh juga lebih padat sehingga lebih mudah dipisahkan dari cairan.

KESIMPULAN

Isolasi enzim HRP hasil kultur sel tanaman *Armoracia lapatifolia* dapat dilakukan dengan cara fraksinasi menggunakan amonium sulfat. Fraksinasi enzim menggunakan amonium sulfat 40-80% jenuh dan sentrifugasi enzim hasil fraksinasi pada kecepatan 12.500 rpm selama 30 menit menghasilkan enzim dengan kemurnian 42,87 kali dibandingkan ekstrak kasarnya dan dengan perolehan sebesar 59,65 %.

DAFTAR PUSTAKA

1. S. Loprasert, S. Negoro and H. Okada. *Thermostable Peroxidase from Bacillus stearothermophilus*. J.Gen.Microbiol., 134, 1971-1976 (1988).
2. Yamada, Y., Setsuo Kobayashi, Watanabe, K.,

- Uzo H. *Production of Horseradish Peroxidase by Plant Cell Culture*. J. Chem. Tech. Biotechnol, 38: 31-34 (1987).
3. Agrawal, R., M. V. Patwardhan. *Production of Peroxidase Enzyme by Callus Cultures of Citrus aurantifolia* S. Jour. Sci Food Agric., 61, 377-378 (1993).
4. Yetti M. Iskandar, S. Pudjiraharti dan A. T. Karossi. *Biosintesis Horseradish (Armoracia lapatifolia) Peroksidase dengan Teknik Kultur Jaringan*. Buletin IPT, 4 (2), 2-6 (1996).
5. S. Pudjiraharti and A.T.Karossi, *Purification and characterization of white radish (Raphanus sativus L. var Long white) peroxidase from cell culture extract*, In-press, Majalah Teknologi Indonesia , Desember 2009.
6. S. Pudjiraharti, A.T. Karossi, Y.M. Iskandar and Thelma A. Budiwati, *Purification of HRP by ammonium sulfate precipitation*, The Second JSPS-NCRT-DOST-LIPI-VCC Seminar on Sustainable Development of Biotechnology in Tropics, Thailand 19-21 November 1997.
7. I. Soda, T. Hasegawa, T. Suzuki and N. Ogura. *Purification and Some Properties of Peroxidase from Kiwifruit*. J. Agric. Biol. Chem., 55 (6), 16779-1678 (1991).
8. A. Signoretta and J. Crouzet. *Tomato Peroxidase : Purification by Affinity Chromatography*. J. Agric. Biol. Chem., 46 (2), 1459-464 (1982).
9. G. Mazza, C. Charles, M. Bouchet, J. Richard and J Raynaud. *Isolement, Purification et Propriete's Physico-Chimiques Des Peroxydases De Navet*. Biochimica et Biophysica Acta., 167, 89-98 (1968).
10. M.L. Wilkinsons, J.M. Griffiths and R.R . Alexander. *Basic Biochemical Methods*. John Wiley & Sons, New York, 1985.
11. Yetti M. Iskandar, S. Pudjiraharti dan A. T. Karossi. *Produksi Enzim Peroksidase Dari Kalus Armoracia lapatifolia*. Prosiding Pemaparan Hasil Litbang IPTEK, Bandung, 14-16 Oktober 1996.
12. S.P. Colowick and N.O. Kaplan. *Methods in Enzymology*, 43, Academic Press, Inc., New York, 698-727 (1975).
13. Saunders, B.C., Holmes Siedle, A.G., and Stark, B.P. *Peroxidase*. Butterworth & Co., Limited, London (1964).